维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0669-04

热休克小鼠肝癌细胞(H_{22})源 Exosomes 的制备及其蛋白组成的初步研究

杨 麟,沈 宜,李 静,陈 黎

(重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨热休克对小鼠肝癌细胞 H_{22} 分泌的 Exosomes 产量及蛋白组分的影响,为进一步研究 Exosomes 在生产和免疫治疗方面的改进提供理论依据。方法:经超速分级离心和蔗糖密度梯度离心纯化得到 H_{22} 细胞分泌的 Exosomes 和经热休克处理后 H_{22} 细胞分泌的 Exosomes(Heat shocked Exosomes,HS-Exo),透射电镜观察其形态,SDS-PAGE 电泳分析其蛋白带组成,Western Blot 检测两者所含有的免疫分子情况。结果:在透射电镜下,HS-Exo 与 Exosomes 形态相似,直径约 20~90nm 的膜性囊泡,结构完整;经热休克处理后小鼠肝癌细胞 H_{22} 分泌的 Exosomes 产量增多,且在 HS-Exo 中表达的热休克蛋白 70(HSP70)、热休克同源蛋白 70(HSC70)、热休克蛋白 60(HSP60)、粘附相关蛋白(ICAM-1)与在 Exosomes 中的表达相比显著上调($P<0.05$)。结论:超速分级离心及蔗糖密度梯度离心提取纯化热休克小鼠肝癌细胞 H_{22} 源的 Exosomes 的方法具有可行性;HS-Exo 中 HSP70、HSC70、HSP60、ICAM-1 的表达比 Exosomes 更为丰富,提示 HS-Exo 可能比 Exosomes 具有更强的免疫活性。

【关键词】Exosomes;肝癌细胞;热休克;肿瘤疫苗

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-15

Separation and identification of the Exosomes derived from heat shocked mouse hepatoma cell line(H_{22}) and preliminary investigation of its protein composition

YANG Lin, et al

(*Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of heat shock on the production and protein composition of Exosomes derived from a mouse hepatoma cell line(H_{22}) in order to provide theoretical basis for the improvement in production and immunol therapy of exosomes. *Methods*: Normal Exosomes and heat shocked Exosomes(HS-Exo) were purified by serial ultracentrifugation and sucrose density gradiant centrifugation, then were observed and identified by electron microscopy. The protein composition of Exosomes and HS-Exo were analysed by SDS-PAGE electrophoresis. And their immunological factors were detected by Western blot. *Results*: Under the electron microscopic view, HS-Exo had similar morphologic pattern to Exosomes, and the structure was complete, as vesicles with a diameter ranging from 20~90nm; The production was increased in heat shocked Exosomes. And the expressions of immunological factors such as HSP70, HSC70, HSP60, ICAM-1 in HS-Exo were significantly up-regulated than those in Exosomes. *Conclusion*: Serial ultracentrifugation and sucrose density gradiant centrifugation can be used to purify HS-Exo. HSP70, HSC70, HSP60, ICAM-1 were expressed more in HS-Exo than in Exosomes, which may suggest that Exosomes derived from heat-shocked H_{22} cells would have more effective immunostimulatory functions.

【Key words】Exosomes; Hepatoma cell; Heat shock; Tumor vaccine

Exosomes 作为一种新发现的细胞外排体,引起了众多关注,尤其是其表达的蛋白的多样性及其能激发体内外 CD_8^+T 细胞依赖的抗肿瘤反应[1]。而目前如何提高 Exosomes 的产量,使其成为一种新型高效的肿瘤疫苗,能更好地应用于肿瘤的免疫治疗成为了新兴的研究方向。本实验通过提取小鼠肝癌细胞 H_{22} 分泌的 Exosomes 及小鼠肝癌细胞 H_{22} 热休克后分泌的 Exosomes,经透射电镜及 SDS-PAGE 电泳鉴定和观察,Western Blot 分析两者的蛋白质组成成

作者介绍:杨 麟(1983-),女,硕士,研究方向:肿瘤免疫。

通讯作者:沈 宜,女,副教授,E-mail:shenyicq@163.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

分及其带有的免疫相关抗原，为进一步研究热休克处理对 Exosomes 的产量、组成成分的影响及其在免疫调节和治疗方面的作用提供理论依据，希冀为具有抗肿瘤作用的新型高效的肿瘤疫苗的研制提供新思路。

1 材料和方法

1.1 细胞和试剂

小鼠肝癌细胞株(H_{22})由本教研室提供。胎牛血清(杭州四季青公司)，RPMI-1640(美国 GIBCO)，重水(青岛腾龙微波科技有限公司)，分析纯蔗糖(国药集团化学试剂公司)，考马斯亮蓝 G250 和 R250(上海化学试剂公司)，SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、5XSDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、BeyoECL 荧光检测试剂(碧云天生物技术研究所)，PVDF 膜(Millipore 公司)，兔抗小鼠 HSP70、HSP60、ICAM-1(武汉博士德)，兔抗小鼠 HSC70(Santa Crus 公司)，辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(北京中杉金桥)。

1.2 主要方法

1.2.1 细胞培养 小鼠肝癌细胞株(H_{22})培养在 10%胎牛血清 RPMI1640 培养液中(内含 0.1%青霉素、链霉素)，并置于 37℃、5%CO_2 培养箱内备用。

1.2.2 H_{22} 细胞的热休克 取生长状态良好的 H_{22} 细胞，先进行 43℃热休克(水浴)2h 后，置于 37℃ CO_2 孵箱恢复 4h，收取培养上清。

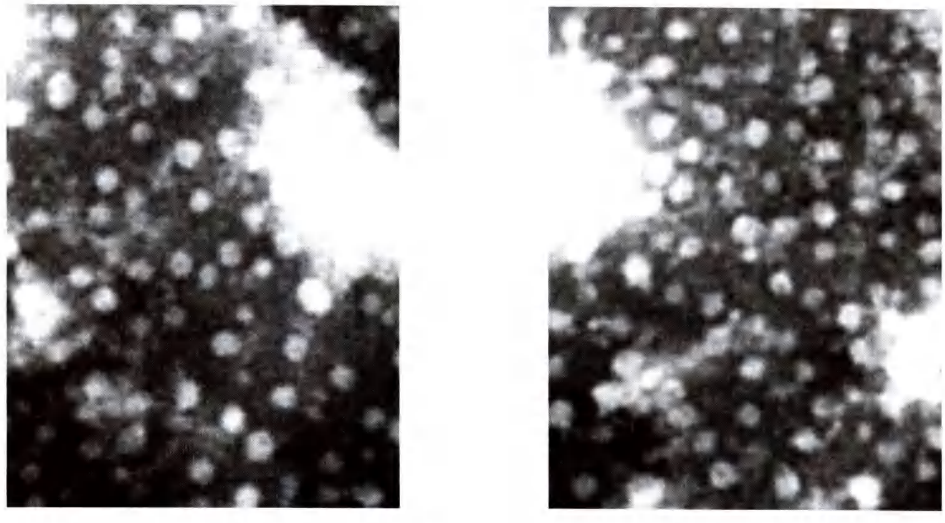
1.2.3 Exosomes 及 HS-Exo 的制备 分别取未经热休克 H_{22} 细胞和经热休克 H_{22} 细胞上清液各 200ml，300g 离心 10min 去除细胞；800g 离心 30min 去除细胞碎片得上清液；10 000g 离心 30min 取上清液；100 000g 低温超速离心 1h 收集沉淀重悬于 PBS；90 000g 离心 75min 去除与 Exosomes 质量相近的细胞碎片，将收集的上清液加到含有 300g/L 蔗糖的重水垫之上，100 000g 低温超速离心 50min，收集离心管底部的缓冲垫用 PBS 稀释，经 100 000g 低温超速离心 1h，收集沉淀重悬于 PBS，-80℃保存。采用 Bradford 法分别定量 Exosomes 及 HS-Exo 的总蛋白[2]。

1.2.4 电镜分析 分别滴约 20μl Exosomes 及 HS-Exo 悬液于载样铜网上，用滤纸吸干液体，滴加 2%磷钨酸溶液(pH 6.8)，负染 1min，滤纸吸干负染液，门炽灯烤干约 10min，于透射电镜下观察照相。

1.2.5 Western Blot 分析 (1)10%SDS-PAGE 电泳 Exosomes 及 HS-Exo 经 Bradford 法测蛋白浓度后各取 30μg 上样于 PAGE 凝胶；(2)蛋白质转膜 电泳后将 PAGE 凝胶中的蛋白质通过湿法电转移方法转移至 PVDF 膜上；(3)与一抗结合 转移完毕后，用含 5%脱脂牛奶的 TBST，室温封闭 PVDF 膜 1h，将 HSP70、ICAM-1、HSP60、HSC70 一抗分别用含 5%脱脂牛奶的 TBST 按 1∶200 稀释，将膜与一抗置于封闭的塑料袋中，4℃过夜；(4)与二抗结合 TBST 缓冲液充分洗膜 3 次，每次 10min，再与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 于室温下结合 2h；(5)显色 TBST 充分洗膜 3 次，ECL 增强发光试剂显色后，于凝胶成像系统曝光、显影定影后观察结果，采用 Quantity One 软件对图象进行光密度分析。

1.2.6 统计学处理 以上实验重复 3 次，SAS 8.0 软件进行统计学分析，采用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果



Exo　　HS-Exo

图 1 Exosomes 及 HS-Exo 的形态特点(TEM×105 000)

(Exo 为未经热休克 H_{22} 细胞分泌的 Exosomes，HS-Exo 为热休克后 H_{22} 细胞分泌的 Exosomes)

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.1 H_{22} 细胞来源的 Exosomes 及 HS-Exo 的电镜观察

均为膜性的囊泡，直径约为 20～90nm，呈圆形或椭圆形，腔内为低密度光亮区，常多个聚集在一起(图 1)。

2.2 Exosomes 及 HS-Exo 的总蛋白定量(Bradford 法)

Exosomes 分别取 0.02、0.04、0.06ml 测得的 A_{595} 值分别为 0.136 2、0.248 5、0.392 4；同样 HS-Exo 测得的 A595 值分别为 0.160 7、0.298 3、0.403 2。根据标准曲线得出的公式 y=0.006x+0.009，分别算出相应的蛋白量，Exosomes 的平均浓度为(1.13±0.13) mg/ml；HS-Exo 的平均浓度为(1.23±0.06)mg/ml。

2.3 Exosomes 和 HS-Exo 蛋白成分的分析

Western Blot 结果显示相同蛋白上样量的 Exosomes 和 HS-Exo 均含有 HSP70、HSC70、HSP60、ICAM-1，且在 HS-Exo 中以上条带均比在 Exosomes 中加宽、颜色加深(图 2)，通过 Quantity One 软件进行光密度分析，差异有显著意义($P<0.05$)(表 1)。

3 讨 论

肝癌严重威胁着人类的健康，目前的传统治疗方法如手术切除、放疗、化疗等，虽有一定疗效，但也存在一定局限性。生物治疗的研究给肿瘤治疗带来了新的希望，特别是肿瘤疫苗能够激发体内针对肿瘤细胞的全身免疫应答，是一种有前途的肿瘤治疗方法。近年来 Exosomes 的研究已成为肿瘤免疫治疗方面的热点之一。DC 来源的 Exosomes(DEX) 由于含有许多免疫活性物质，研究最为深入而且临床治疗Ⅱ期实验正在进行之中[3]。而肿瘤来源的 Exosomes(TEX)是一种非细胞瘤苗，含有许多与免疫有关的分子，能将抗原呈递给抗原递呈细胞，产生显著的 CD_8^+T 细胞依赖的抗肿瘤免疫反应。目前对于 TEX 的抗肿瘤效应主要集中在 HSC70 所携带的肿瘤抗原多肽诱发的特异性抗肿瘤免疫反应[4]。热休克蛋白是在应激时诱导产生的一个蛋白家族，又称分子伴侣，它能结合并携带、递呈内源性抗原多肽。肿瘤来源的热休克蛋白作为疫苗使用时，能够诱导特异性的抗肿瘤生长的保护性免疫反应。而热休克处理可诱导热休克蛋白的高表达，热休克蛋白以其具有的免疫佐剂效应和提高肿瘤细胞免疫原性的作用参与机体抗肿瘤免疫反应。因此我们在这基础上进行了热休克肿瘤细胞来源的 Exosomes 的制备，并对其生物学行为进行了初步探讨。

本实验分别从小鼠肝癌细胞 H_{22} 上清液和经热休克后小鼠肝癌细胞 H_{22} 上清液中提取制备 Exosomes，采用超速分级离心和蔗糖密度梯度离心相结合的方法，与以往的单一分级离心法相比，Exosomes 纯度有所提高，经透射电镜观察，Exosomes 及 HS-Exo 表现出高度相似的形态特征。通过蛋白定量结果显示从等体积 H_{22} 细胞上清液中提取的 HS-Exo 的总蛋白与 Exosomes 总蛋白相比有显著提高，说明热休克处理能提高 Exosomes 的产量。Western Blot 对两者成分的分析结果显示在 HS-Exo 中一些重要的免疫分子如 HSP70、HSC70、HSP60、ICAM-1 的表达与 Exosomes 相比显著上调，而这些免疫分子在抗肿瘤作用方面具有极其重要的意义，这就提示 HS-Exo 可能比 Exosomes 具有更强的免疫活性，能更好的发挥抗肿瘤的作用：(1)HSP70 作为

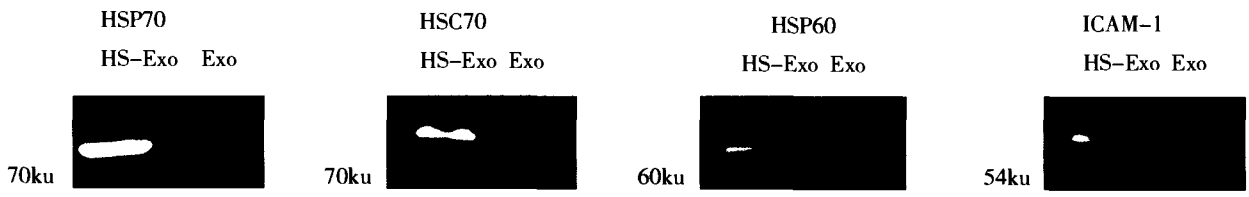


图 2 Western Blot 检测相同蛋白上样量的 HS-Exo 及 Exosomes 中 HSP70、HSC70、HSP60、ICAM-1 蛋白表达的情况

表 1 HS-Exo 及 Exosomes 中 HSP70、HSC70、HSP60、ICAM-1 蛋白表达的情况

组别	HSP70	HSC70	HSP60	ICAM-1
Exo	26.81±0.62	21.25±0.84	17.90±0.36	19.76±0.48
HS-Exo*	31.13±0.89	25.73±0.66	20.77±0.78	22.19±0.79

注：与 Exo 组相比较，*$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

重要的分子伴侣参与细胞内各种新生蛋白分子的组装、折叠、转运，维护了活性蛋白分子的结构和功能完整。另一方面，HSP70 也积极参与机体免疫，参与识别与排斥肿瘤细胞的反应。单纯的 HSP70 是不能起到增强肿瘤免疫原性的作用的，我们从小鼠肝癌细胞 H_{22} 中提取所得的 Exosomes 中检测出的 HSP70 是结合了抗原性多肽的 HSP，是 HSP- 肽复合物(Heat shock protein peptide complex，HSP-PC)[5]，它与一般外源性抗原不同，可诱导机体产生对其来源细胞具有杀伤活性的 CD_8^+CTL，与机体的抗肿瘤免疫有着密切关系。它不仅参加肿瘤抗原的加工呈递，而且可作为抗原递呈分子直接将肿瘤抗原呈递给 T 细胞，激发 T 细胞介导的特异性肿瘤细胞免疫。可观察到经过热休克处理后 HS-Exo 高表达 HSP70 分子，说明 HS-Exo 可能诱发机体产生更强烈的抗肿瘤免疫反应。(2)H_{22} 细胞经热休克后分泌的 Exosomes 高表达了 HSC70，研究证明肿瘤来源的 HSC70 可诱导机体产生强大的 CTL 反应并能部分消除肿瘤[6]。其次，其携带的多肽可以有效的转移给抗原呈递细胞(APC)，以便于 MHC-Ⅰ和 MHC-Ⅱ类抗原的呈递[7]。Exosomes 可以通过 Exosome-APC 和 Exosome-T 相互作用的方式促进抗原的递呈和 T 细胞的活化。甚至在缺乏任何多肽抗原刺激的情况下，HSC70 也能刺激巨噬细胞诱导的 T 细胞活化[8]。(3)HSP60 是吞噬细胞所共有的一个特性，并且结合吞噬细胞表面的 HSP60 受体，迅速引起吞噬细胞的胞饮作用。APC 如树突状细胞(DC)和吞噬细胞可有效的吞噬凋亡细胞，识别抗原并将抗原提呈给MHC-Ⅰ类分子，但是在生理状态下，由于缺乏危险信号分子的协助，这并不激活免疫系统的反应。表达于凋亡肿瘤细胞表面的 HSP60 可向 DC 和吞噬细胞提供必要的危险信号，从而使 DC 和吞噬细胞分泌致炎细胞因子，促进 DC 的成熟，并最终引起 T 细胞抗肿瘤免疫[9]。HS-Exo 中高表达的 HSP60 在肿瘤免疫过程中是诱发机体 T 细胞抗瘤免疫的必要信号分子，在它的作用下无免疫原性的肿瘤凋亡细胞获得了免疫原性。(4)ICAM-1 为免疫球蛋白家族的一种粘附分子，使细胞与细胞或基质间发生粘附，参与细胞的识别、细胞的活化和信号转导。ICAM-1 与其配体的结合具有重要的免疫学功能：首先它介导了 T细胞和 NK 细胞对靶细胞的杀伤作用；其次，它还是 T 细胞激活的共刺激信号之一[2]。

由于携带有丰富免疫分子如 HSP70、HSC70、HSP60、ICAM-1 的热休克肿瘤细胞来源的 Exosomes 为非细胞性结构，且未经基因修饰和外源基因导入，不含遗传物质，因此对机体潜在危害作用小，且制备简单易行，为研制有临床应用前景的新型生物制剂和肿瘤疫苗提供了新途径。

参 考 文 献

[1] Vidal M, Mangeat P, Hoekstra D. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation[J]. Cell Sci, 1997; 110(Pt16): 1867-1877.

[2] 李 静，沈 宜，汤为学. 小鼠肝癌细胞(H_{22})源 Exosomes 的制备及其免疫相关蛋白的初步研究[J]. 中华肝脏病杂志，2007; 15(6): 421-423.

[3] Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccine for cancer immunotherapy[J]. Annu Rev Med, 1999; 50(2): 507-529.

[4] Chaput N, Schartz NE, Andre F, et al. Exosomes for immunotherapy of cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2003; 532: 215-221.

[5] 郑金平，祝寿芬. 热休克蛋白与抗肿瘤免疫及其应用[J]. 山西医科大学学报，2003; 34(4): 354-358.

[6] Blott EJ, Griffiths GM. Secretory Lysosomes[J]. Nature Rev. Mol. Cell Biol, 2002; 3: 122-131.

[7] Savina A, Furlan M, Vidal M, et al. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells[J]. J Biol Chem, 2003; 278(22): 20083-20090.

[8] Pelham HR. SNARES and the specificity of membrane fusion[J]. Trands Cell Biol, 2001; 11: 99-101.

[9] 张 明，刘立思. 热休克蛋白 60 与肿瘤关系的研究进展[J]. 国外医学分子生物学分册，2003; 25(2): 105-108.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 668 页)

islets[J]. Blood, 2005; 106(2): 419-427.

[8] Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2005; 11(5): 321-334.

[9] Guo Z, Yang J, Liu X, et al. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow[J]. Chin Med J(Engl), 2001; 114(9): 950-953.

[10] Yao M, Dieterle T, Hale SL, et al. Long-term outcome of fetal cell transplantation on postinfarction ventricular remodeling and function[J]. J Mol Cel Cardiol, 2003; 35(6): 661-670.

[11] Idilman R, Kuzu I, Erden E, et al. Evaluation of the effect of transplant-related factors and tissue injury on donor-derived hepatocyte and gastrointestinal epithelial cell repopulation following hematopoietic cell transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 2006; 37(2): 199-206.

(责任编辑：谭乐勤)